

## Ein einfaches Verfahren zur Isolierung freier und konjugierter Gallensäuren im Serum

Von F. BEGEMANN

*Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. H. Bartelheimer) Hamburg*

(Eingegangen am 7. April 1971)

Zur Isolierung freier und konjugierter Serum-Gallensäuren wird folgendes Verfahren angegeben: Dünnschichtchromatographische Abtrennung störender Begleitlipide im äthanolischen Serumextrakt mit Chloroform (äthanolfrei) — Diäthyläther 6:1 (v/v) im Durchlaufverfahren. Anschließend Auftrennung der am Startpunkt verbliebenen Gallensäuren auf dem gleichen Trägermedium mit Butanol-Eisessig-Wasser 10:0,7:0,5 (v/v) oder anderen Systemen nach spezieller Wahl. Die Methode ist einfach und weitgehend verlustfrei.

### *A simple method for isolation of free and conjugated bile acids from serum*

The following procedure for the isolation of serum-bile acids is described: interfering lipids are eliminated from alcoholic extracts of serum by continuous-elution-thin-layer-chromatography with ethanol-free chloroform — diethylether 6:1 (v/v), after which the bile acids are separated from the starting point with butanol — acetic acid — water 10:0.7:0.5 (v/v) or other systems on the same plate. The method is simple and involves minimal losses.

Die Dünnschichtchromatographie bietet eine einfache Methode zur Isolierung und Bestimmung von Gallensäuren. Ihre Erfassung im Serum bereitet jedoch Schwierigkeiten, da quantitativ überwiegende Lipide mit chromatographisch ähnlichen Eigenschaften den Trennungsansatz stören.

FROSCH und WAGENER (1) benutzen zur Lipidentfernung eine Phasenverteilung im System Äther-Heptan-Äthanol-Wasser (1:1:1:1). Hierbei gehen jedoch freie Gallensäuren verloren, deren Nachweis unter pathologischen Bedingungen (2, 3, 4) von Interesse sein kann.

Eine präparative dünnschichtchromatographische Lipidabtrennung (5, 6) isoliert zwar die Gesamtgallensäuren-Fraktion. Ihre anschließende Elution zur Auftrennung der Einzelkomponenten führt jedoch zu Verlusten infolge erheblicher Hafttendenz am Kieselgel (5, 7). Das hier angegebene Verfahren vermeidet diesen Nachteil und ist weniger umständlich: störende Lipide in äthanolischen Serumextrakten werden zur Erzielung einer maximalen Distanz durchlaufchromatographisch abgetrennt. Damit entfällt eine Elution der am Startpunkt zurückbleibenden Gallensäuren. Sie werden in einem zweiten Trennungsschritt auf dem gleichen Träger entwickelt.

### Material und Methoden

Chloroform, Diäthyläther, Di-Isopropyläther, Äthanol absol., Butanol-(1), Essigsäure 99—100%, sämtlich p. a., Fa. Merck. Kieselgel G nach STAHL, DC-Fertigplatten (Merck), Aluminiumoxid, basisch, Akt. I, (Woelm, Eschwege), Streichgerät der Fa. Desaga.

Durchflußkammer nach TRUTER (Shandon Lab., Frankfurt) Einfach-Trennkammer (Desaga).

2—5 ml Serum werden tropfenweise zur 7fachen Menge absol., auf etwa 70° erhitzten Äthanol gegeben. Nach 15 Min. Inkubation bei gleicher Temperatur wird abzentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wird zweimal mit heißem Äthanol gewaschen und

filtriert. Die vereinigten Extrakte werden im Rotationsverdampfer eingengt; der Trockenrückstand wird in einem Äthanolvolumen von 0,5 ml aufgenommen. Aliquote Teile davon werden strichförmig auf selbstgefertigte oder handelsübliche, bei 110° für 30 Min. aktivierte Kieselgelplatten von 0,25 mm Schichtdicke aufgetragen. Anschließend erfolgt in einer geeigneten Vorrichtung, (z. B. Kammer nach TRUTER), eine kontinuierliche Durchlaufchromatographie im System Chloroform-Diäthyläther 6:1 (v/v) bei Raumtemperatur. Unmittelbar vor Zusammenstellung des Fließmittels wird Chloroform durch adsorptive Filtration an basischem Aluminiumoxid von äthanolischen Stabilisierungszusätzen befreit (8). Dabei genügen für 110 ml Chloroform 40 g Aluminiumoxid auf einer Säule von 20 mm Innendurchmesser. Die ersten 15 ml des Durchlaufes gibt man nochmals auf die Säule. Frischer Diäthyläther p. a. wird ohne weitere Reinigung benutzt; ältere, peroxidhaltige Chargen (Jodkali-Stärkeprobe) können nach gleicher Vorschrift gereinigt werden (9). Umständliche Redestillationsmaßnahmen werden so vermieden. Für einen guten Durchlauftreff ist die Sättigung der Kammeratmosphäre mit dem gleichen Fließmittel wesentlich (Filterpapierauskleidung).

Nach 5 Stdn. sind die störenden Lipidfraktionen des aufgetragenen Serumextraktes als schmale Bande an der Frontzone konzentriert (Abb. 3b, Bahn 2), während Gallensäuren nahezu am Auftragsort zurückbleiben (Abb. 3b, Bahn 3). In Startpunktnähe bleiben auch Bilirubin, Phospholipide und Monoglyceride. Eine während der Durchlaufchromatographie etwa 2,5 cm abhebende, nicht näher identifizierte Bande (Abb. 3b, Bahn 2) liegt im  $R_F$ -Wertbereich eines vergleichsweise geprüften 1-Monostearat-Standards. Monoglyceride und Phospholipide wandern bei der nachfolgend beschriebenen Gallensäurenentwicklung in der Frontzone des Lösungsmittels (5). Die hier erwähnte Bande verhält sich gleichartig.

Ähnliche Trennergebnisse erhält man mit folgenden Fließmittelsystemen: Chloroform-Diäthyläther 7:1 (v/v) (7 Stdn.), Chloroform-Di-Isopropyläther 5:1 (v/v) (10 Stdn.) und 7:1 (v/v) (15 Stdn.). Die variable Dauer der Trennungsansätze gestattet so eine weitgehende Anpassung an die jeweiligen Arbeitsverhältnisse. Selbstgefertigte Platten erzielten die erstrebten Trennungsergebnisse durchschnittlich etwas schneller als handelsübliche Fertigplatten.

Die Bedeutung der durchlaufchromatographisch erzielten Lipidabtrennung geht aus Abbildung 1 hervor: Hier sind Gallensäureauftrennungen ohne und mit

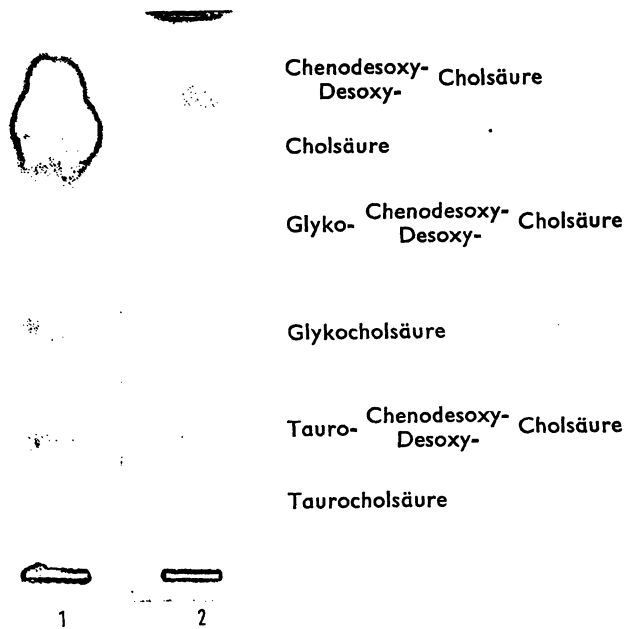


Abb. 1

Gallensäureauftrennung eines äthanol. Serumextraktes im System Butanol-Eisessig- $H_2O$  10:0,7:0,5 (v/v)  
 Bahn 1 ohne vorherige Lipidabtrennung  
 Bahn 2 nach durchlaufchromatographischer Lipidentfernung (Chloroform-Diäthyläther, 6:1, (v/v) 5 Stdn.)  
 Pat.-Nr. 03476/71. Ikterus bei Pankreas-Ca. mit Lebermetastasen. Serum-Bilirubin 220 mg/l, Serum-Gesamtfett 21,00 g/l, freie Cholsäure im Serum als Spur nachweisbar. Zur Verdeutlichung Zusatz freier Cholsäure und Desoxycholsäure (Serva, Heidelberg)

vorhergehender Lipidentfernung einander gegenübergestellt. Der frontnahe Lipid-Schmierfleck in der nicht vorbehandelten Probe erreicht in Normalseren geringere Ausmaße. Er interferiert aber immer mit den Zonen der unkonjugierten Gallensäuren und den angrenzenden Banden der Glyko-Dihydroxykonjugate. Außerdem sind bei ungereinigten Serumextrakten feinere Schleifspuren der Frontlipide mit Hilfe markierter Verbindungen selbst noch in tieferen Bezirken des Chromatogramms nachzuweisen (4). Sie stören auch in geringer Menge quantitative Bestimmungen der einzelnen Gallensäuren, besonders bei enzymatischen und fluorometrischen Verfahren (10, 11, 12). Über die Trenngüte der Durchlaufchromatographie orientieren die in Abbildung 2 zusammengestellten Radio-Dünnschichtchromatogramme. Sie wurden mittels Radio-Dünnschichtchromatograph FHT 780 C der Fa. Frieske-Berthold nach Versetzen der Serumextrakte mit  $^{14}C$ -markierten Lipiden und Chromatographie in der beschriebenen Weise erhalten. Schon eine einmalige Entwicklung entfernt die störenden Lipide vom Auftragsort. (Cholesterin-Ester standen in markierter Form nicht zur Verfügung; sie wandern vor der Triglyceridfraktion). Nach kontinuierlicher Durchflußentwicklung mit Lipid-Akkumulation an der Front entsteht eine schleifspurfreie Zwischenstrecke. Ein geringer Mittransport, besonders der freien Mono- und Dihydroxysäuren, fällt nicht als Nachteil ins Gewicht, da die relativ geringe Trennungstendenz unkonjugierter Gallensäuren in manchen der nachfolgend anzuwendenden Fließmittelsystemen da-

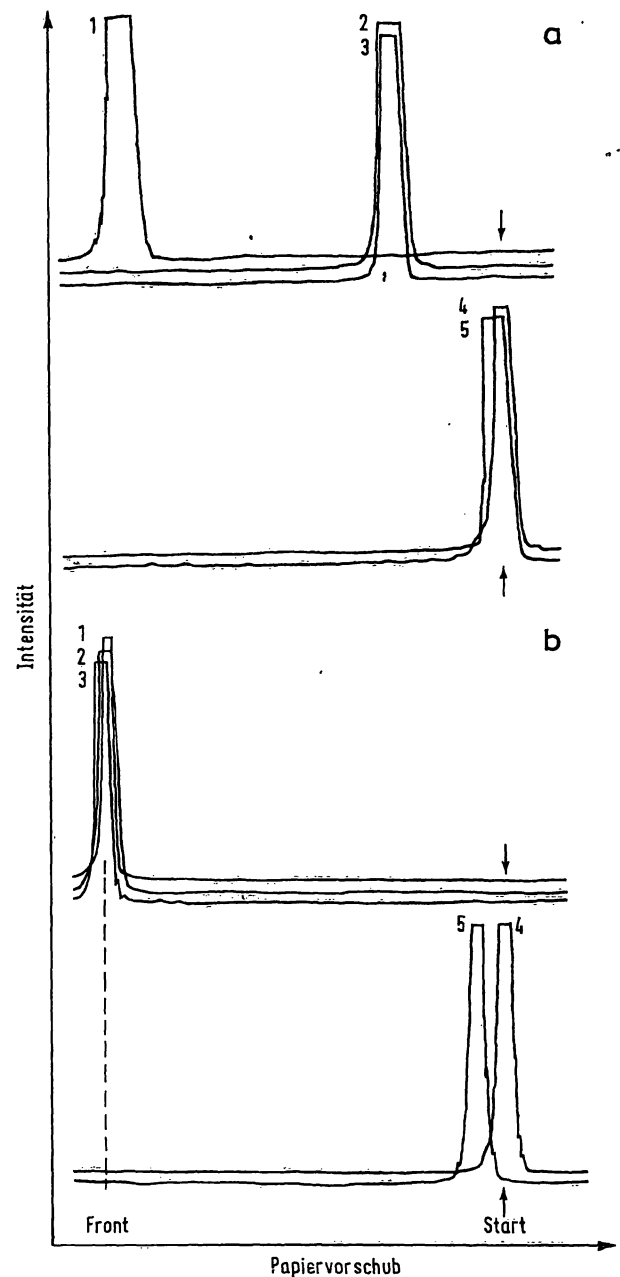


Abb. 2

Scanningdiagramme von Radio-Dünnschichtchromatogrammen einiger  $^{14}C$ -markierter Lipide und Gallensäuren im System Chloroform-Diäthyläther 7:1 (v/v)

a) nach Einfach-Entwicklung (1 1/2 Stdn.)  
 b) nach Durchlaufentwicklung (7 Stdn.)

1 = Tripalmitin, 2 = Cholesterin, 3 = Palmitinsäure, 4 = Cholsäure, 5 = Lithocholsäure. (1—4: Radiochem. Amersham, 5: NEN, Boston)  
 Empfindlichkeit jeweils auf Anschlag des Meß-Systems bei Aktivitätsmaximum eingestellt

durch eher verbessert wird. Bei Verringerung des Diäthylätheranteils oder Verwendung von Di-Isopropyläther beobachteten wir einen noch geringeren Mitschleppereffekt. Die DC-Platten werden nach der Durchlaufchromatographie 10 Min. luftgetrocknet bei einer Maximaltemperatur bis 40°. Eine Hitzeaktivierung würde die nachfolgende Gallensäureauftrennung durch zu starke Fixierung am Kieselgel behindern. Die Auswahl des Fließmittelsystems zur Gallensäureentwicklung wird man der besonderen Fragestellung im Einzelfall anpassen. Eine übersichtliche Darstellung der wichtigsten freien und konjugierten

Gallensäuren ist unter den Bedingungen der hier auftretenden Vorabtrennung dekonjugierter Gallensäuren mit einem an die Angaben von GÄNSHIRT und Mitarbeitern (13) angelehnten System Butanol-Eisessig- $H_2O$  10:0,7:0,5 (v/v) zu erzielen. Bilirubin, das in manchen Systemen mitwandert und dadurch stören könnte, bleibt am Auftragsort zurück (5).

Zur Abschätzung der Verlustrate des chromatographischen Verfahrens wurden konstante Probenvolumina von  $^{14}C$ -Lithocholsäure-haltigen Serumextrakten auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Etwaige Verluste im Verlauf des Trennungsganges müßten am ehesten bei dieser Substanz mit der weitesten Wanderungsstrecke während der Gallensäurenentwicklung nachweisbar sein. Die Aktivitätsrate der spezifischen Kieselgelbezirke einer Probengruppe ohne weitere Behandlung (I) und einer weiteren nach Durchlaufchromatographie mit anschließender Gallensäureaufreinigung (II) wurden miteinander verglichen. Die Abgrenzung der spezifischen Bezirke nach Chromatographie erfolgte anhand eines mitgelaufenen Referenzstandards, die Szintillationsmessung im Spektrometer Packard Tricarb 3003; der Quencheffekt wurde durch internen Standard korrigiert. Als Mittelwerte ergaben sich bei Gruppe I 5230 Imp./Min. ( $s = \pm 72$ ,  $n = 10$ ) und bei II 5134 Imp./Min. ( $s = \pm 109$ ,  $n = 10$ ). Bei  $0,01 < p < 0,05$  betrug die Wiederfindungsrate somit 98,2%. Mit störenden Gallensäurenverlusten ist daher während des gesamten chromatographischen Verfahrens nicht zu rechnen.

### Diskussion

Das hier verwendete System hat sich uns innerhalb der untersuchten Mischungen zweier oder mehrerer polarer und unpolarer Fließmittel als optimal zur Lösung der gestellten Frage erwiesen. Geprüft wurden in diesem Zusammenhang außerdem: Chloroform, Benzol, Toluol, Diäthyläther und Aceton als alleinige Fließmittel sowie verschiedene Mischungen aus Iso-Octan, Heptan, Hexan bzw. Cyclohexan, Benzol, Toluol,

Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff in Kombination mit Diäthyl- und Di-Isopropyläther, Äthanol, Methanol, Äthoxyäthanol, Äthylacetat, Dioxan, Dichloräthan, Dichlormethan, Aceton, Methyläthylketon, Tetrahydrofuran. Chloroform ist nach Reinigung an Aluminiumoxid hinsichtlich Äthanolfreiheit und damit auch hinsichtlich Apolarität der redestillierten Form etwa vergleichbar. PANVELIWALLA und Mitarbeiter (3) berichteten bereits über eine absteigende dünnschichtchromatographische Trennung von Lipiden und Gallensäuren mit redestilliertem Chloroform. Allerdings mußten unhandlich große Plattenformate in Kauf genommen werden. Wir kamen mit gereinigtem Chloroform bei der üblichen, aufsteigenden Entwicklung zu abweichenden Ergebnissen (Abb. 3a, Bahn 1): Bei einmaliger Entwicklung blieben zwar Gallensäuren am Auftragsort zurück, andererseits wanderten die Hauptlipide des Serums z. T. nur geringe Strecken und erreichten keineswegs Frontnähe. Demgegenüber führte das ohne Vorreinigung untersuchte Chloroform p. a., das 0,6–1,0% Äthanol als Stabilisator enthält, zu deutlich erhöhten Wanderungsstrecken der Lipide (Abb. 3a, Bahn 2). Eine weitere Steigerung der Lipidwanderungstendenz konnten wir erst nach Substitution des als polare Komponente wirkenden Alkohols durch einen Äther erzielen (Abb. 3a, Bahn 3). Die Alkoholelimination ist dabei empfehlenswert, um einen zu großen Mitschleppeffekt der Gallensäuren zu vermeiden.

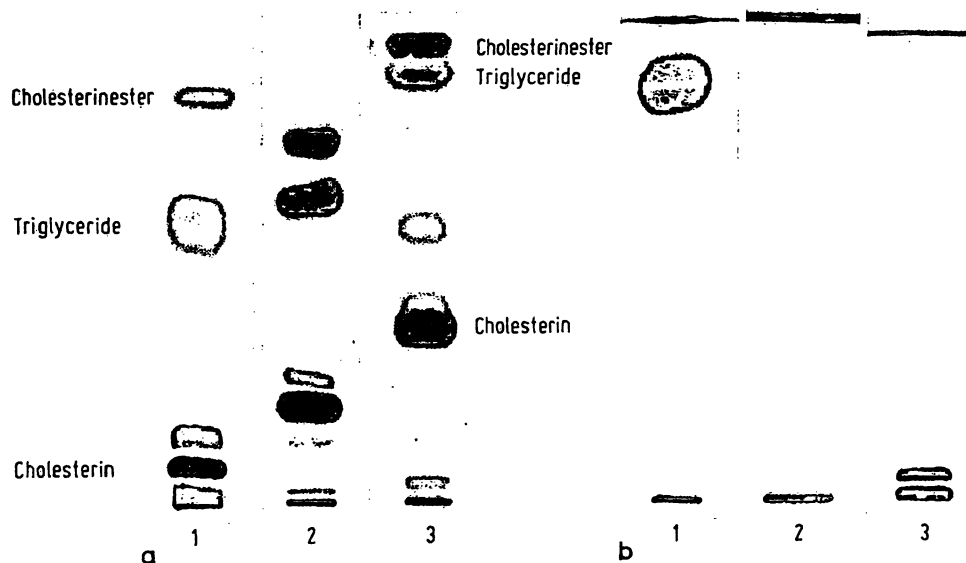
Die so erzielte Distanz von Lipiden und Gallensäuren erwies sich aber bei Verwendung üblicher Chromatographieplatten von  $20 \times 20$  cm noch nicht als ausreichend für eine Auftrennung des am Auftragsort zurückbleibenden Gallensäuregemisches. Eine Lösung bot die von TRUTER (14) angegebene Durchlaufchromatographie. Sie führt durch Abdampfen des Fließmittels an der Frontzone zu einer kontinuierlichen Entwicklung, so daß auch Substanzen mit geringerer Wanderungstendenz schließlich an der Frontzone erscheinen. Auf diese Weise entsteht auch auf üblichen

Abb. 3

a) Einfach-Chromatographie eines äthanolischen Serumextraktes, (Normalserum eines gesunden Probanden)  
Bahn 1 gereinigtes Chloroform  
Bahn 2 Chloroform p. a. (0,6–1,0% Äthanol)  
Bahn 3 Chloroform (gereinigt)–Diäthyläther, 6:1 (v/v)

b) Durchlaufchromatographie im System Chloroform(gereinigt)–Diäthyläther, 6:1 (v/v)

Bahn 1 Serum nach 4 Stdn.: Cholesterin dicht vor Front  
Bahn 2 Serum nach 5 Stdn.: Hauptlipide strichförmig in der Frontlinie konzentriert. Unidentifizierte, flauere Bande etwa 2,5 cm über Startpunkt  
Bahn 3 Gallensäurenstandard: Knappe Abhebung unkongjugierter Anteile vom Startpunkt



Plattengrößen genügend Platz für die Entwicklung der Gallensäuren in einem nachfolgenden Trennungsschritt.

Anschließend ist eine quantitative Bestimmung der einzelnen Gallensäuren möglich, etwa mittels  $H_2SO_4$ -Farbreaktion (1), oder, weit empfindlicher, auf enzymatischem Wege unter Einwirkung der  $3\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (12). In beiden Fällen können die spezifischen Kieselgelbezirke nach Abtragen von der Platte direkt in den Bestimmungsansatz überführt

werden (1, 15), wobei sich Substanzverluste weitgehend vermeiden lassen. Da schon die alkoholische Serumextraktion Gallensäuren quantitativ erfaßt (1, 16) und auch bei der hier beschriebenen, weiteren Auftrennung störende Verluste nicht vorkommen, wäre mit einer solchen methodischen Kombination zur quantitativen Gallensäuren-Bestimmung ein weitgehend verlustfreies Verfahren gewährleistet.

Für die Untersuchungen wurden z. T. Sachmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (BE 310/7) benutzt.

### Literatur

1. FROSC, B und H. WAGENER, *Klin. Wschr.* 46, 913 (1968). —
2. LEWIS, B., D. PANVELIWALLA, S. TABAQCHALI und J. D. P. WOOTTON, *Lancet*, London 1969/I 219. —
3. PANVELIWALLA, D., B. LEWIS, J. D. P. WOOTTON und S. TABAQCHALI, *J. Clin. Path.*, London 23, 309 (1970). —
4. BEGEMANN, F., *Klin. Wschr.* 49, 808 (1971). —
5. FROSC, B., Habilitationsschrift, Heidelberg 1965. —
6. CURTIUS, H.-CH., *diese Z.* 4, 27 (1966). —
7. TURNBERG, L. A. und A. ANTHONY-MOTE, *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam 24, 253 (1969). —
8. WOHLLEBEN, G., *Angew. Chem.* 68, 752 (1956). —
9. HESSE, G., *Chromatographisches Praktikum. Methoden der Analyse in der Chemie*, Band 6. Akadem. Verlagsgesellschaft Frankfurt/M. (1968). —
10. HOFMANN, A. F., L. J. SCHOENFIELD, B. A. KOTTKE und J. R. POLEY, *Meth. Med. Res.* Chicago 12, 149 (1970). —
11. FROSC, B. und H. WAGENER, *Klin. Wschr.* 42, 901 (1964). —
12. IWATA, T. und K. YAMASAKI, *J. Biochem.*, (Tokyo) 56, 424 (1964). —
13. GÄNSHIRT, H., E. W. KOSS und K. MORIANZ, *Arzneimittel-Forsch.*, Aulendorf 10, 943 (1960). —
14. TRUTER, E. V., *J. Chromatogr.* 14, 57 (1964). —
15. BRUUSGAARD, A., *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam 28, 495 (1970). —
16. OLIVECRONA, T. und S. SJÖVALL, *Acta physiol. Scand.* 46, 284 (1959).

Dr. F. Begemann  
Universitäts-Krankenhaus Eppendorf  
I. Med. Univ.-Klinik  
2 Hamburg 20  
Martinistr. 52